

F 60/02294



REC'D 26 SEP 2000
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 AOUT 2000

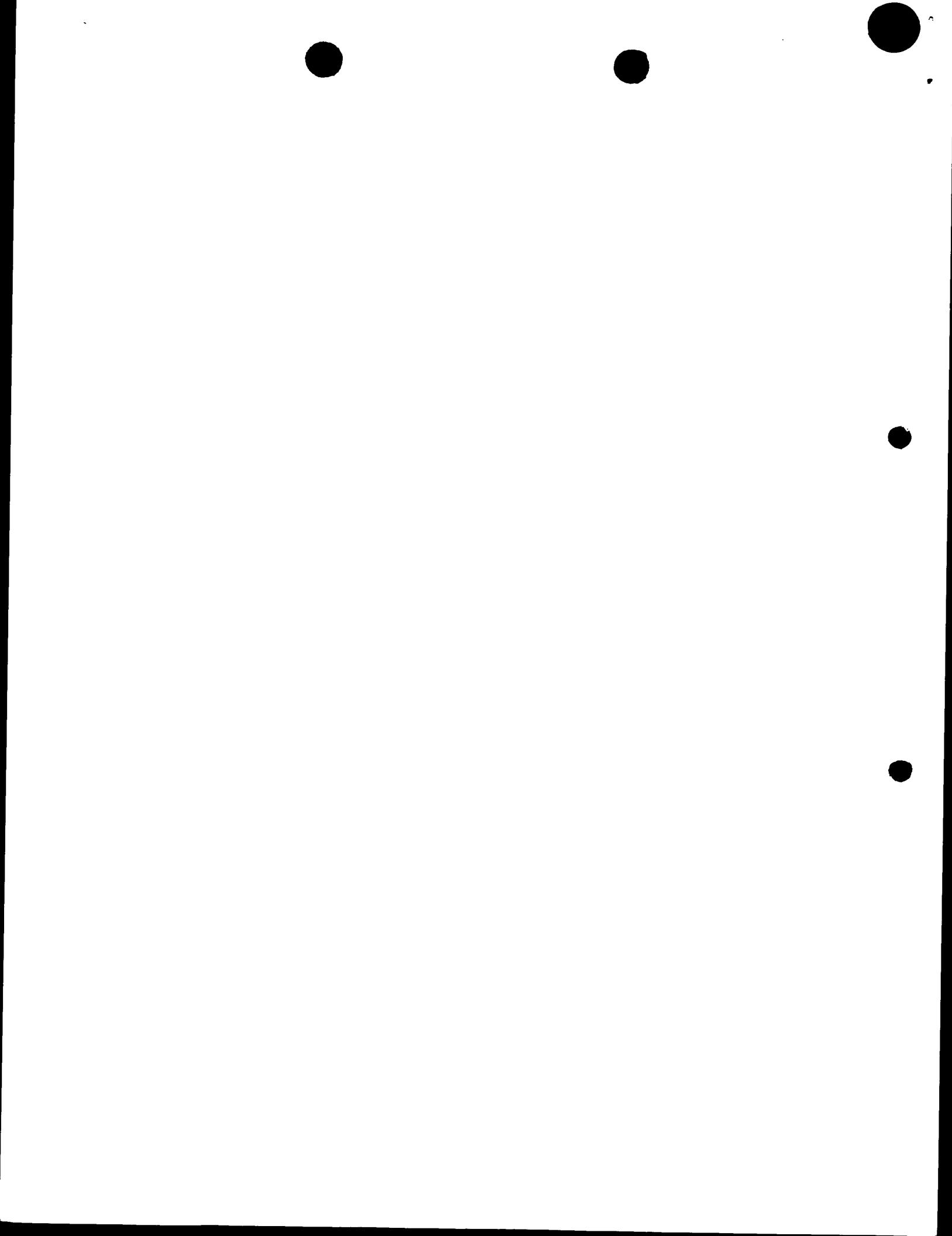
Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine Planche', is enclosed in an oval shape.

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

SIEGE
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

11 AOUT 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9910410

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75 INPI PARIS B

DATE DE DÉPÔT

11 AOUT 1999

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire



certificat d'utilité

transformation d'une demande de brevet européen

brevet d'invention

n°du pouvoir permanent références du correspondant

F17B5783FR

téléphone

01.47.03.67.77.

date

certificat d'utilité n°

Établissement du rapport de recherche

différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE D'IDENTIFICATION DE COMPOSES CAPABLES DE MODULER LA LIBERATION DE NEUROMEDIATEUR ET LES KITS POUR SA MISE EN OEUVRE.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS -

Nationalité (s) **FRANCAISE**

Adresse (s) complète (s)

Pays

**3, rue Michel Ange
75794 PARIS CEDEX 16**

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**BREESE Pierre
921038**

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	F17B5783FR																																		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	99/10410																																		
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)																																			
PROCEDE D'IDENTIFICATION DE COMPOSES CAPABLES DE MODULER LA LIBERATION DE NEUROMEDIATEUR ET LES KITS POUR SA MISE EN OEUVRE.																																			
LE(S) DEMANDEUR(S) :																																			
Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS-																																			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).																																			
<table border="1"> <tr> <td>Nom</td> <td>ISRAEL</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Maurice</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue 2, rue Aristide Briand</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville 91440 BURES-SUR-YVETTE</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td>Nom</td> <td>LESBATS</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Bernard</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue 12, rue des Capucines</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville 91220 PLESSIS PATE</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td>Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="2"> DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) </td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <p>Le 07 Décembre 1999</p> <p>BREESE Pierre</p> <p>921038</p> </td> </tr> </table>		Nom	ISRAEL	Prénoms	Maurice	Adresse	Rue 2, rue Aristide Briand		Code postal et ville 91440 BURES-SUR-YVETTE	Société d'appartenance (facultatif)		Nom	LESBATS	Prénoms	Bernard	Adresse	Rue 12, rue des Capucines		Code postal et ville 91220 PLESSIS PATE	Société d'appartenance (facultatif)		Nom		Prénoms		Adresse	Rue		Code postal et ville	Société d'appartenance (facultatif)		DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		<p>Le 07 Décembre 1999</p> <p>BREESE Pierre</p> <p>921038</p>	
Nom	ISRAEL																																		
Prénoms	Maurice																																		
Adresse	Rue 2, rue Aristide Briand																																		
	Code postal et ville 91440 BURES-SUR-YVETTE																																		
Société d'appartenance (facultatif)																																			
Nom	LESBATS																																		
Prénoms	Bernard																																		
Adresse	Rue 12, rue des Capucines																																		
	Code postal et ville 91220 PLESSIS PATE																																		
Société d'appartenance (facultatif)																																			
Nom																																			
Prénoms																																			
Adresse	Rue																																		
	Code postal et ville																																		
Société d'appartenance (facultatif)																																			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)																																			
<p>Le 07 Décembre 1999</p> <p>BREESE Pierre</p> <p>921038</p>																																			

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
		pt 12/12,		23/12/99	31 DEC. 1999 - VD
13/11 à 11/M				23/12/99	31 DEC. 1999 - VD
p33, 40, 41				13.03.00	16 MARS 2000 - VD

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

PROCÉDÉ D'IDENTIFICATION DE COMPOSÉS CAPABLES DE MODULER LA LIBÉRATION DE NEUROMÉDIATEUR ET LES KITS POUR SA MISE EN ŒUVRE.

5 La présente invention concerne des compositions et méthodes pour la mise en évidence ou la caractérisation de composés agissant sur la libération de neuromédiateurs. Elle concerne également des préparation de tissu nerveux utiles pour la mise en œuvre de ces méthodes, et
10 10 l'utilisation des composés ainsi identifiés ou caractérisés comme agents thérapeutiques ou comme leads pour le développement d'agents thérapeutiques.

15 Conscients des problèmes que posent à notre société les atteintes du système nerveux, qu'elles soient neurodégénératives ou liées au tonus mental (dépression, psychose) ou à des traumatismes, les groupes pharmaceutiques et les organismes de recherche académique ont lancé des projets ambitieux ayant pour but de comprendre et de
20 20 prévenir ces pathologies. A cet effet de nouvelles thérapies, basées sur la greffe de cellules modifiées sécrétrices de médicament, ainsi que la découverte de nouveaux produits assurant une prévention ou un pré traitement sont devenues des objectifs prioritaires pour de nombreux laboratoires. Il faut cependant réaliser que les neurotransmissions centrales ainsi que les processus qui les régulent sont complexes et qu'il est souvent difficile de situer la cible des neurotoxiques endogènes ou exogènes. Il est donc essentiel de disposer de technologies permettant
25 25 d'explorer rapidement un nombre important de produits agissant sur une série importante de cibles potentielles.

30 Les méthodes utilisées aujourd'hui par l'industrie pharmaceutique sont longues, lourdes et laborieuses. Ainsi, ces méthodes reposent essentiellement sur l'étude de ce qui se passe après la libération des neuromédiateurs, c'est-à-dire l'étude des événements post-synaptiques.

La présente invention propose de nouvelles méthodes et compositions permettant d'aborder l'étude, la prévention et le traitement des pathologies du système nerveux avec des chances plus grandes de succès. La présente invention repose notamment sur l'étude de la modulation de la neurotransmission par son aspect pré-synaptique. L'invention permet donc d'agir non pas sur les effets ou sur les symptômes, mais directement sur l'origine et les causes des pathologies. La présente invention permet l'étude simultanée de nombreux composés tests sur des préparations de tissu nerveux, et offre des niveaux de fiabilité et de reproductibilité importants.

Ce but est atteint selon la présente invention, grâce à un procédé d'identification de composés capables de moduler la libération de neuromédiateur, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux et en ce que l'on détermine l'éventuel effet modulateur dudit composé sur la libération de neuromédiateur par ladite préparation de tissu nerveux.

La présente invention est remarquable en ce qu'elle offre une série de dosages de neurotransmetteurs, rapides, simples, sensibles et fiables, qui peuvent être utilisés en temps réel sur des préparation vivantes, telles que cerveaux perfusés, coupes de tissus, terminaisons nerveuses isolées (synaptosomes), cultures de cellules, etc. Le procédé selon l'invention s'intéresse à la libération des neuromédiateurs, c'est à dire au plan pré-synaptique de la neurotransmission, alors que les techniques d'investigation décrites dans l'art antérieur concernent sur les aspects post-libératoires, comme l'action sur les récepteurs, les inhibiteurs de recapture ou d'enzyme de dégradation des neuromédiateurs.

Selon une forme de réalisation préférée, le procédé de l'invention est caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux, puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence d'une ou plusieurs substances dont l'une au moins est capable de réagir avec un neuromédiateur

libéré par la préparation de tissu nerveux, et en ce que l'on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composés à tester en détectant ou en dosant une ou plusieurs desdites substances détectables si un neuromédiateur est libéré, ou en détectant ou en dosant au moins un produit résultant de la transformation de l'une desdites substances si un neuromédiateur est libéré.

La mise en contact de la préparation de tissu nerveux avec le ou les composés à tester est effectuée pendant une durée suffisante pour permettre audit composé d'exprimer un éventuel effet sur ladite préparation.

Le procédé de l'invention permet de tester des composés isolés, un mélange de composés, un échantillon biologique, une banque combinatoire, une molécule synthétique ou naturelle, etc. Il peut s'agir d'un produit connu, dont on souhaite caractériser l'activité, ou de produits inconnus ou de mélanges indéfinis. Comme indiqué ci-après, l'invention décrit des préparations de tissu nerveux qui permettent de disposer d'un grand nombre d'échantillons de matière cérébrale à partir d'un seul animal, ce qui permet de tester de manière simultanée ou séquentielle des quantités importantes de composés, notamment des banques de composés.

Ainsi, le procédé de l'invention peut consister à mettre en contact plusieurs composés à tester soit séquentiellement, soit simultanément, en parallèle ou non, avec la préparation de tissu nerveux.

Pour une mise en contact simultanée, le ou les composés testés sont par exemple mis en solution avec la substance détectable, puis le mélange obtenu est mis en contact avec la préparation de tissu nerveux. Dans un autre mode de mise en œuvre, le ou les composés testés et la solution comprenant la ou les substances dont l'une au moins est capable de réagir avec un neuromédiateur sont conditionnés séparément et introduits simultanément dans le milieu comprenant la préparation de tissu nerveux. Le surnageant est ensuite récolté et le dosage réalisé.

Pour une mise en contact séquentielle, la préparation de tissu nerveux peut être mise en contact dans

un premier temps avec la solution comprenant une ou plusieurs substances dont l'une au moins est capable de réagir avec un neuromédiateur. Ceci permet éventuellement d'éliminer le bruit de fond lié à la présence éventuelle de neuromédiateur résiduel dans le milieu. Dans un second temps, le ou les composés testés sont ajoutés, et la substance détectable est dosée.

Le procédé de l'invention permet, outre de tester plusieurs composés, mais aussi le dosage de plusieurs neuromédiateurs en parallèle. Ainsi, un même composé peut être testé en parallèle pour ses propriétés sur la libération de différents neuromédiateurs, sur des échantillons de tissu nerveux préparés à partir d'un seul animal.

Les résultats obtenus avec le procédé de l'invention et rapportés dans la partie expérimentale ci-après montrent que ce procédé peut être mis en œuvre de manière aisée, reproductible et rapide, sur des échantillons nombreux et biologiquement significatifs de tissu nerveux, pour mettre en évidence de nouveaux composés ou de nouvelles propriétés de composés connus, ou pour affiner le mécanisme d'action ou la spécificité d'action de composés connus. Les compositions et procédés de l'invention sont ainsi utilisables pour la recherche ou le développement de produits thérapeutiques, ou pour toute autre application dans le domaine du système nerveux.

La présente invention concerne également des préparations tissulaires, utiles pour la mise en œuvre du procédé ci-dessus, obtenues *ex vivo* et capables de conserver durant toute l'expérience leurs propriétés physiologiques essentielles. Ces préparations de tissu nerveux permettent des dosages rapides, reproductibles et fiables de nombreux produits agissant sur les mécanismes synaptiques. L'invention concerne tout particulièrement des préparations de microcubes de matière cérébrale, qui permettent de tester un grand nombre de produits à partir d'un seul animal, alors

que les techniques antérieures nécessitent le sacrifice d'un animal par molécule ou sont moins significatives.

5 Un premier type de préparation de tissu nerveux selon l'invention comprend des microcubes de matière cérébrale de mammifère, et de préférence des microcubes de cortex cérébral.

10 Un second type de préparation de tissu nerveux selon l'invention comprend des fibres moussues de matière cérébrale de mammifère, et de préférence des fibres moussues du cervelet ou de l'hippocampe.

15 L'invention concerne en effet la préparation de tissu nerveux permettant des dosages fiables, nombreux et reproductibles à partir d'un même animal. En particulier, l'invention s'intéresse à la préparation de microcubes de matière cérébrale à partir de tissu nerveux, notamment de cerveau entier, de cortex, de cervelet ou tout autre tissu nerveux. Les microcubes présentent l'avantage de conserver les connectivités nerveuses locales et d'être suffisamment oxygénés en milieu physiologique pour assurer une viabilité compatible avec les méthodes de l'invention.

20 Il convient de rappeler que le fractionnement du système nerveux central a conduit, dans les années 1960, à la purification des terminaisons nerveuses (synaptosomes). Depuis cette époque, l'intérêt des neurobiologistes pour ces 25 préparations ne s'est jamais tari. Si ces préparations ont été très utiles pour déterminer la composition biochimique des éléments synaptiques ou pour isoler les protéines qui assurent la neurotransmission, il faut cependant constater que ces études physiologiques et pharmacologiques se sont heurtées à des difficultés liées à la durée de vie brève *in vitro* de ces synaptosomes, obtenus dans des milieux de fractionnement non adaptés à l'étude physiologique. L'isolement des synaptosomes d'organe électrique de Torpille 30 dans des milieux physiologiques semblait alors être une exception puisqu'ils étaient capables de conserver leurs propriétés physiologiques (potentiel de membrane, synthèse et libération d'ACh) pendant au moins 48 heures. Toutefois, 35 des préparations de tissu nerveux mammifère conservant de telles propriétés physiologiques n'a pas été décrite jusqu'à

présent. Les microcubes de matière cérébrale selon l'invention présentent donc un intérêt pharmacologique considérable.

Les microcubes de matière cérébrale constituent une préparation qui offre de multiples avantages. Ainsi, un échantillon de microcubes obtenu à partir d'un cortex est statistiquement comparable à ce cortex entier dans le sens où l'ensemble des neurones contenus dans chaque microcubes se trouve dans un environnement qui est proche de celui qui est le sien dans l'animal entier. Chacun des neurones garde un certain nombre de ses connexions et l'environnement glial reste très stable. Ces deux constances physiologiques sont sans aucun doute responsables de la stabilité et de la longue durée de vie des échantillons de micro cubes. Et même si tous les microcubes ne sont pas équivalents entre eux du fait de l'hétérogénéité du cortex, chaque population constituant l'échantillon est statistiquement identique.

Préférentiellement, les microcubes ont une taille moyenne comprise entre 0,1 et 5 mm³, de préférence entre 0,1 et 3 mm³, encore plus préférentiellement de 1 mm³ environ. Les microcubes peuvent être préparés à partir de tissu nerveux, par découpage puis passage à travers une ou plusieurs grilles de diamètre défini, par exemple entre 0,01 et 2 mm². Il peut s'agir notamment d'une toile de nylon, d'une grille métallique, ou de tout autre support adapté au tamisage. Une illustration de la préparation de microcubes est représentée sur la Figure 1 en annexe, utilisant comme tissu nerveux de départ le cortex cérébral.

Dans un mode particulier de réalisation du procédé de l'invention, après préparation des microcubes et d'un nombre conséquent d'échantillons répartis dans des supports de titration, par exemple des tubes coniques ou des puits de microplaques, on met en contact le ou les composés à tester avec la préparation de tissu nerveux, puis l'on prélève le surnageant sur lequel on effectue le dosage (notamment par chimiluminescence) des médiateurs éventuellement libérés par la préparation de tissu nerveux.

Un autre avantage des microcubes réside dans leur stabilité importante, même après

5 congélation/décongélation. De ce fait, la mise en batterie de ces dosages n'est pas limitée par la durée de la journée de travail, mais les préparations de tissu nerveux peuvent être conservées pour usage ultérieur. Une même préparation permet donc de déterminer avec certitude les effets d'une ou plusieurs séries de composés sur plusieurs (notamment cinq) neurotransmissions en parallèle, ce qui rend les comparaisons d'autant plus faciles que la constitution du cortex des animaux sains est stable.

10 Ces micro cubes offrent en plus des avantages par rapport aux autres préparations existantes et utilisées par l'industrie pharmaceutique :

15 - Comparé aux coupes de cerveau, les échantillons de microcubes sont statistiquement plus homogènes car il est toujours difficile de réaliser deux coupes identiques pour avoir une bonne comparaison entre les manipulations,

20 - Comparé aux synaptosomes, les échantillons de microcubes sont plus stables et ont une durée de vie plus longue car ils ont conservé leur environnement physiologique,

25 - Comparé aux études sur l'animal vivant, les microcubes permettent de réaliser, à partir d'un seul sacrifice, une batterie de tests concernant à la fois plusieurs composés et plusieurs pans de la neurotransmission, ce qui tranche avec les études comportementales, où un animal testé permet de ne répondre qu'à une question (actif ou pas sur un comportement dont la portée est extrapolée).

30 L'invention a donc encore pour objet toute préparation de microcubes de matière cérébrale telle que définie ci avant. Il s'agit préférentiellement d'une composition comprenant au moins 100 microcubes de matière cérébrale tels que décrits ci avant. L'invention concerne aussi l'utilisation de tels microcubes, ou de toute autre préparation conservant les connectivités locales, pour l'identification de composés modulant la libération de neuromédiateurs.

5 Comme indiqué précédemment, une variante avantageuse du procédé de l'invention, consiste à utiliser une préparation de tissu nerveux comprenant des fibres moussues de matière cérébrale mammifère, notamment des fibres moussues du cervelet ou de l'hippocampe.

10 Les fibres moussues contiennent des terminaisons nerveuses glutamatergiques d'un diamètre de 5 à 10 µm. Celles-ci ne sont, en général, pas préservées lorsque l'on homogénéise le tissu nerveux pour isoler des petits synaptosomes (0.5 µm). Selon la présente invention, on utilise comme préparation de tissu nerveux des fibres moussues, préparées de manière à conserver lesdites terminaisons nerveuses. Ces fibres peuvent être préparées par fragmentation du tissu de manière plus douce, dans une solution physiologique, ce qui permet de préserver ces grandes terminaisons glutamatergiques. Des fibres moussues préparées dans ces conditions et utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention sont décrites sur la Figure 2 en annexe.

20 D'autres préparations de tissu nerveux peuvent être utilisées, telles que des lignées cellulaires exprimant des phénotypes de neurotransmission, des coupes de cerveau, le liquide céphalo-rachidien, etc. Toutefois, il est particulièrement préféré, pour les raisons évoquées ci avant, d'utiliser des préparations conservant les connectivités locales et qui peuvent être produites en nombre important à partir d'un seul animal, telles que des microcubes.

30 La mise en contact du ou des composés à tester avec la préparation de tissu nerveux peut être réalisée dans tout dispositif approprié à une réaction de dosage, tel que des tubes, puits, plaques, support, etc. Il s'agit préférentiellement de tubes ou de puits de microtitration. Typiquement, les dosages sont réalisés sur des plaques de titration.

5

La détection ou le dosage d'une ou plusieurs substances détectables si un neuromédiateur est libéré, ou d'au moins un produit résultant de la transformation de l'une desdites substances si un neuromédiateur est libéré, peut être effectué de différentes façons, selon la nature de la substance à doser.

10

Dans un mode particulièrement préféré de mise en œuvre, le procédé utilise des substances froides, c'est-à-dire non radioactives. Le procédé concerne tout particulièrement la détection ou le dosage d'une substance conduisant à une émission de lumière en présence de neuromédiateur, le dosage de la substance consistant alors en le dosage ou la détection de la lumière émise.

15

20

Ainsi, dans un mode tout préféré, le procédé de l'invention comprend un dosage par chimiluminescence, ce qui permet des dosages rapides, précis et nombreux des neuromédiateurs. Les substances ou mélanges de produits conduisant à une émission de lumière en présence de neuromédiateur peuvent être par exemple, selon le neuromédiateur, une combinaison de luminol et de peroxydase, de décaldéhyde et de luciférase ou par exemple la NADH-FMN oxydoréductase.

25

30

Ainsi, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que l'on en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux en présence d'une une plusieurs enzymes dont le substrat de l'une au moins est un neuromédiateur et d'au moins un agent capable d'émettre de la lumière suite à la dégradation dudit neuromédiateur par son enzyme.

35

Comme indiqué précédemment, le dosage du neuromédiateur peut être effectué dans le surnageant de culture des préparations de tissu nerveux, après traitement de celui-ci pour transformer le neuromédiateur en substrat de la réaction d'émission de lumière. Ainsi, dans un mode particulier, le dosage consiste à détecter un produit de transformation du neuromédiateur. Pour cela, le neuromédiateur est préalablement traité pour produire ce

produit de transformation. Différents traitements peuvent être utilisés, selon le neuromédiateur concerné.

A titre de neuromédiateur dont la libération est détectée ou dosée selon le procédé de l'invention, on peut citer notamment le glutamate (Glu), l'acétylcholine (Ach), le γ -aminobutyrate (Gaba), les catécholamines notamment la dopamine (Da), ou l'ATP.

L'application du procédé de l'invention au dosage ou à la détection de l'acétylcholine est caractérisé en ce que l'on en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnagent en présence, successivement ou simultanément, d'acétylcholinestérase, de cholineoxydase, de peroxydase, et de luminol, et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du luminol suite à la dégradation par l'acétylcholinestérase de l'acétylcholine libéré par la préparation de tissu nerveux.

La figure 3a en annexe représente le dosage de l'acétylcholine (Ach). Pour ce dosage le médiateur est hydrolysé par l'acétylcholinestérase, et la choline qui en résulte est oxydée par la cholineoxydase en présence de luminol et de peroxydase. Même lorsqu'un échantillon contient de la choline et de l'ACh, on peut lire séquentiellement les deux substances : lorsque la luminescence due à la choline s'éteint, on ajoute de l'acétylcholinestérase et la lumière qui apparaît donne le taux d'ACh. Ce type de test a été appliqué sur certains échantillons nerveux, essentiellement non mammifère ou ne permettant pas des études sur des gammes assez larges de composés (Israel et Morel, Rev. Neurol. 143 (1987) 89). La présente invention montre à présent que ce type de test peut être utilisé à grande échelle, sur des préparation particulières de tissu nerveux, et en batterie avec d'autres tests de dosage de neuromédiateur.

L'application du procédé de l'invention au dosage ou à la détection du glutamate est caractérisé en ce

que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux, puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, de glutamate desydrogénase, d'oxydoréductase, de luciférase, de NAD et de décaldéhyde, et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du décaldéhyde suite à la dégradation par la glutamate desydrogénase du glutamate libéré par la préparation de tissu nerveux.

La figure 3b en annexe représente le dosage du glutamate. Pour ce dosage le glutamate est par exemple déshydrogéné par l'enzyme glutamate deshydrogénase ; le NADH₂ qui apparaît étant ensuite attaqué par l'enzyme NADH-FMN oxydoréductase; ce qui déclenche en présence de décaldéhyde et de luciférase de photobactérium, une émission lumineuse. Ce type de dosage a été mis en œuvre dans d'autres conditions, expérimentales, sur des terminaisons nerveuses d'organes électriques (Israel et al., Neurochem. Int. 22 (1993) 53). La présente invention montre à présent que ce type de test peut être utilisé à grande échelle, sur des préparation particulières de tissu nerveux, et en batterie avec d'autres tests de dosage de neuromédiateur.

L'application du procédé de l'invention au dosage ou à la détection du Gaba est caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, de gabase, d'oxydoréductase, de luciférase, de NAD et de FMN et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du SSAL suite à la dégradation par la gabase du Gaba libéré par la préparation de tissu nerveux.

La figure 3c en annexe représente le dosage du Gaba. Pour ce dosage, l'enzyme Gabase est utilisée pour convertir le Gaba en aldéhyde semi succinique avec production de NADH₂. L'aldéhyde semi succinique et le NADH déclenchent, en présence de NADH-FMN oxydoréductase, l'émission de lumière. L'avantage de ce test est qu'il n'est

pas nécessaire d'ajouter un aldéhyde exogène. Ce type de dosage a été mis en œuvre dans d'autres conditions, expérimentales, sur des terminaisons nerveuses d'organes électriques (Israel et Lesbats., J. Neurochem. 67 (1996) 2624). La présente invention montre à présent que ce type de test peut être utilisé à grande échelle, sur des préparations particulières de tissu nerveux, et en batterie avec d'autres tests de dosage de neuromédiateur.

L'application du procédé de l'invention au dosage ou à la détection des catécholamines est caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnagent en présence, successivement ou simultanément, de lactopéroxydase, d' O_2 et de luminol et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du luminol suite à la dégradation par la lactopéroxydase d'une catécholamine libérée par la préparation de tissu nerveux.

Les figures 3d et 3e en annexe représentent le dosage des catécholamines, notamment de la dopamine. Pour le dosage de la dopamine, la présente invention se rapporte à un test particulièrement efficace, basé sur la mise en évidence de propriétés d'une enzyme dans la transformation de la dopamine. Ainsi, la présente invention montre que l'enzyme lactopéroxydase, en présence de O_2 , conduit à la formation de H_2O_2 , puis, en présence de ce dernier et de luminol, la même lactopéroxydase catalyse la formation de lumière. De ce fait, de manière inattendue, la lactopéroxydase apparaît comme possédant à la fois une action peroxydase classiquement décrite et une action oxydase.

La présente invention se rapporte donc aussi à un test basé sur une catécholamine luminescente et ses applications pour contrôler le relargage d'un transmetteur adrénnergique. Un nombre croissant d'oxidases a été utilisé pour mesurer leur substrat spécifique (glucose, xanthine, choline, etc (Michelson 1978 et Takayama et al. 1977). Dans le

cas du transmetteur acétylcholine (Ach) il a été proposé en 1980 un procédé dans lequel la choline résultant de l'hydrolyse de l'ACh était oxydée par la choline oxydase en formant du peroxyde d'hydrogène, ce dernier étant détecté en utilisant une réaction chimiluminescente (luminol plus peroxydase) (Israel et Lesbats, 1981 a, b, 1982, 1987). Pour d'autres transmetteurs tels le glutamate (Glu) ou le γ aminobutyrate (Gaba), le test chimiluminescent correspondant a été trouvé, Glu et Gaba sont des substrats pour des deshydrogénases donnant du NADH qui déclenche la luminescence des luciférases bactériennes sensibles aux aldéhydes (Fosse et al, 1986 ; Israel et al, 1993 ; Israel et Lebats, 1996). Si l'on ajoute à ces transmetteurs l'ATP, détecté par les luciférases de luciole (De Luca et Mc Elroy, 1978 ; Meunier et al, 1975) on se rend compte que beaucoup de transmetteurs sont maintenant mesurés à l'aide de méthodes chimiluminescentes. Dans le cas des monoamines, la procédure de Tenne pour la monoamine oxydase convertit les amines aliphatiques en aldéhydes aliphatiques qui déclenchent la luminescence de systèmes bactériens sensibles aux aldéhydes à longue chaîne (Tenne et al, 1985 a, b).

L'action de la monoamine oxydase sur les catécholamines produit du peroxyde d'hydrogène (Cadet et Brannock, 1998) qui a pu être détecté à l'aide du luminol. Il a maintenant été mis en évidence dans le cadre de la présente invention que la lactopéroxydase de lait présente une fonction mixte oxydase - peroxydase, elle a été capable d'oxyder des catécholamines et de catalyser la réaction du peroxyde formé avec le luminol, générant ainsi l'émission de lumière. Ainsi, il a été mis au point un test sensible qui mesure aussi bien la norépinephrine, l'épinephrine ou la dopamine, il réagit très faiblement avec la L-DOPA ou la sérotonine. Ce test a été appliqué pour contrôler le relargage de catécholamines des tissus et des cellules adrénnergiques.

L'invention a donc aussi pour objet un procédé de dosage de catécholamine dans un échantillon, comprenant la mise en contact de cet échantillon avec la lactopéroxydase et le luminol, et le dosage de la lumière émise. L'échantillon

5

peut être tout surnageant de culture de cellules nerveuses, de microcubes de cerveau, ou de toute autre préparation de tissu nerveux, éventuellement après stimulation de la libération de catécholamines par dépolarisation au calcium et incubation en présence du composé test. Ce dosage peut être utilisé pour doser l'épinéphrine, la norépinéphrine, la dopamine, etc.

10

L'invention se rapporte aussi à un kit pour la mise en œuvre d'un procédé décrit précédemment. Un tel kit comprend :

15

- une ou plusieurs préparations de tissus nerveux dans des compartiments séparés,

20

- une ou plusieurs substances dont l'une au moins est capables de réagir avec un neuromédiateur libéré par la préparation de tissu nerveux, et l'une au moins desdites substances est détectable si un neuromédiateur est libéré ou dont au moins un produit résultant de la transformation de l'une desdites substances est détectable si un neuromédiateur est libéré.

- éventuellement un ou plusieurs composés de référence dont l'effet sur la libération d'un ou plusieurs neuromédiateurs par la préparation de tissu nerveux est connu.

25

30

La mise en contact du ou des composés à tester avec la préparation de tissu nerveux, dans un kit selon l'invention, peut être réalisée dans tout dispositif approprié à une réaction de dosage, tel que des tubes, puits, plaques, support, etc. Il s'agit préférentiellement de tubes ou de puits de microtitration. Typiquement, les dosages sont réalisés sur des plaques de titration.

35

L'invention concerne enfin les composés capables de moduler la libération pré synaptique de neuromédiateurs identifiable par un procédé selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention se rapporte à l'utilisation d'un tel composé pour la fabrication d'un médicament destiné

au traitement ou à la prévention de maladies du système nerveux.

En effet, les composés identifiés ou caractérisés selon le procédé de l'invention peuvent soit augmenter, soit inhiber la libération de médiateur. Ainsi, selon les pathologies concernées, il peut être avantageux de chercher à augmenter ou à réduire la quantité de médiateur libérée. A cet égard, les composés identifiés peuvent constituer des composés à usage thérapeutique, ou bien des leads (cibles) pour le développement de tels agents thérapeutiques. Les applications de ces composés sont par exemple :

- pour les composés modulant la libération d'acétylcholine, la neurodégénérence et la maladie d'Alzheimer,

- pour les composés modulant la libération de glutamate, la neurotoxicité et l'ischémie,

- pour les composés modulant la libération de Gaba, l'épilepsie et l'anxiété,

- pour les composés modulant la libération de catécholamines (dopamine), la psychose, la dépression, la maladie de Parkinson,

- pour les composés modulant la libération d'ATP, l'anxiété, la panique, les phobies, la maladie de Parkinson.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent, donnés à titre illustratif et non limitatif, et qui décrivent les dosages en chimiluminescence de quatre médiateurs (ACh, Glu, Gaba et Da) sur une préparation de microcubes de matière cérébrale et sur des fibres moussues. Bien entendu d'autres préparations, entrant dans le cadre de la présente invention sont également disponibles, telles que les cellules exprimant divers phénotypes de neurotransmission, la mesure du glutamate du liquide céphalo-rachidien pour évaluer l'excito-toxicité .

Il sera fait référence dans ce qui suit aux dessins en annexe, dans lesquels :

- La Figure 1 représente la production de microcubes de matière cérébrale, et leur utilisation pour le dosage de neuromédiateurs.

5 - La Figure 2 représente la production et l'aspect de fibres moussues glutamatergiques, et leur utilisation pour le dosage de neuromédiateurs.

10 - La Figure 3 représente le principe des dosages de l'acétylcholine (Figure 3a), du glutamate (Figure 3b) et du Gaba (Figure 3c). La Figure 3d représente le principe du test catécholamine-luminescent, la Figure 3e représente le dosage de la dopamine et de la norépinéphrine. Les différents dosages permettent de détecter quelques picomoles de l'un des médiateurs. Une proportionnalité entre la lumière émise et le taux de médiateur est montrée sur les figures pour chaque médiateur.

15 - La Figure 4 représente le remplissage de cellules en neuromédiateurs et leur utilisation pour le dosage de neuromédiateurs. Les cellules sont chargées en neuromédiateur en l'ajoutant au milieu de culture (10 mM). Les cellules sont lavées 5 à 6 fois, puis reprises dans un volume de milieu, pour aboutir à une concentration de 1 nanomole de neuromédiateur dans 5 µl environ. Différents phénotypes de neurotransmetteurs sont ainsi exprimés par les lignées cellulaires.

20 - La Figure 5 représente le dosage du glutamate dans le liquide céphalo-rachidien.

25 - La Figure 6 représente le dosage des catécholamines sur une préparation de cellules adrénergiques dissociées, en solution saline (A) ou non saline (B).

30 - La Figure 7 représente le dosage des catécholamines sur une préparation de microcubes de cerveau stimulée par du KCl en présence de calcium (7A) ou d'EGTA (7B).

35 - La Figure 8 représente la détermination du contenu en catécholamines des extraits biologiques.

- La Figure 9 représente le relargage de catécholamine par des fragments de glande surrénale.

- La Figure 10 représente le relargage de catécholamines par des cellules de neuroblastome enrichies en dopamine au cours de leur culture.

5

Exemple 1 : Matériel et Méthodes.

10

La lactopéroxydase (EC1.11.1.7) de lait bovin a été obtenue de Sigma sous forme de poudre lyophilisée (80-150 Unités / mg de protéine). Le luminol (5-amino-1,2,3,4-tétrahydrophthalazindione-1,4) a été obtenu de Merck. Une solution stock à 1 mM a été préparée en diluant 18 mg dans quelques gouttes de NaOH 1M, et le volume final a été porté à 100 mM par ajout de tampon Tris 0,2 M, pH 8,6.

15

Le milieu de Krebs mammifères est composé de 136 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,2 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 1,2 mM phosphate de sodium, 2,5 mM de bicarbonate de sodium, 5,5 mM glucose, oxygéné .

20

Exemple 2: Préparation de microcubes de matière cérébrale et utilisations pour le dosage de neuromédiateurs (Figure 1).

25

Le cortex d'un rat ou d'une souris (ou d'un autre mammifère, y compris humain) est disséqué et découpé en cubes de 1 à 2 mm³ environ avec une lame de scalpel. Ces cubes sont lavés dans un volume de Krebs mammifères (au moins deux fois 250 mL) puis aspirés à l'aide d'une pipette P5000 et forcés au "jet" à travers une toile Nylon rigide ayant une maille de 1 mm de côté environ. Les cubes ainsi calibrés sont récoltés au fond d'un bêcher par sédimentation spontanée ce qui réduit les centrifugations plus "traumatisantes", puis les microcubes sont récoltés dans un volume progressivement plus réduit. Les microcubes sédimentent au fond d'un tube conique et sont couverts par 1 ou 2 mL de Krebs. Lorsque l'on pipette dans un culot de 20 à 50 µL de ces microcubes à l'aide d'une pipette Gilson pointe jaune à l'extrémité coupée pour élargir l'entrée, on prélève un nombre égal de microcubes de sorte que l'on peut tester

30

35

la libération de médiateur sur des échantillons statistiquement comparables. On peut par exemple incuber des échantillons de 50 µL de microcubes avec une série de composés à différentes concentrations, et analyser leurs effets sur la libération spontanée ou induite par dépolarisation au potassium par rapport à un témoin. Les dosages de quatre neuromédiateurs peuvent être d'autre part répartis sur plusieurs jours puisque ces préparations sont congelables.

Cette méthode a été mise en œuvre de manière particulièrement efficace dans le cas de l'ACh, du Gaba, du glutamate ou de la dopamine (Figures 3). Pour ce qui est du glutamate, il est ailleurs décrit une préparation plus idoine, consistant en la mesure de la libération de ce médiateur à partir de terminaisons nerveuses de fibres moussues de cervelet ou de l'hippocampe.

Exemple 3: Préparation de fibres moussues glutamatergiques du cervelet ou de l'hippocampe et utilisations pour le dosage de neuromédiateurs (Figure 2).

Les terminaisons nerveuses des fibres moussues ont un diamètre de 5 à 10 µm (Fig. 2) et ne sont, en général, pas préservées lorsque l'on homogénéise le tissu nerveux pour isoler des petits synaptosomes (0.5 µm) qui sont habituellement purifiés. Si l'on prend la précaution de fragmenter le tissu de manière plus douce dans une solution physiologique, il est possible de préserver ces grandes terminaisons glutamatergiques. A cet effet, des quantités de tissus de 0.1 g environ ont été dissociées par aspiration-expiration dans un volume de 0.3 mL à l'aide d'une pipette Gilson pointe bleue. Cet "homogénat" est ensuite ramené à 2 mL de Krebs et filtré sur une toile de Nylon de 50 µm. Les terminaisons nerveuses des fibres moussues sédimentent spontanément dans la fraction nucléaire. Ce culot est lavé 1 ou 2 fois dans du Krebs par sédimentation spontanée puis resuspendu dans 1 mL de Krebs. Ces terminaisons nerveuses

vont libérer le médiateur lorsqu'on les dépolarise en présence de calcium et seront stables longtemps.

5 Pour étudier l'effet de composés sur la libération de glutamate, on utilise en général 3 à 5 µl de cette suspension, qui sont ajoutés au milieu réactionnel de dosage du glutamate, la libération étant déclenchée par l'addition de KCl en présence de calcium. Les résultats obtenus montrent que cette préparation de tissu nerveux 10 constitue un matériel de choix pour des dosages répétés, sur un grand nombre d'échantillons.

15 Exemple 4: Lignées cellulaires exprimant divers phénotypes de neurotransmission (Figure 4).

Il a été montré que l'on pouvait charger des cellules en cultures avec l'un des trois médiateurs ACh, Glu ou Gaba en l'ajoutant durant 5 à 12 heures au milieu de culture (Israël et al., Neuropharmacology 36 (1997) 1789). 20 Les modalités techniques sont différentes pour chaque médiateur. Dans le cas de l'ACh par exemple (Figure 4), il est nécessaire de bloquer au préalable les cholinestérases (phospholine 50 µM). Dans tous les cas, cependant, la concentration intracellulaire de médiateur devient proche de 25 la concentration extracellulaire utilisée (ici 10 mM) mais on peut la porter à 40 mM. Après lavage du milieu, les cellules gardent le médiateur incorporé. La comparaison des contenus en ACh, Gaba et Glu de diverses lignées cellulaires est effectuée en lysant quelques µl de la suspension dans le 30 milieu de mesure, avec 0.5% ou 0.05% triton pour les cellules chargées en ACh ou Glu respectivement, et en les portant préalablement à 80°C pour le Gaba puis en dosant le médiateur ainsi libéré. Certaines lignées cellulaires libèrent préférentiellement l'ACh, d'autres le Gaba ou le 35 glutamate (Fig.4). Même si les microcubes constituent un matériel de choix, ces lignées sont également utilisables dans les procédés de l'invention pour l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler la libération de neuromédiateurs.

Exemple 5: Etude de l'excito-toxicité de glutamate mesuré dans le liquide céphalo-rachidien (Figure 5).

5 Les altérations du système nerveux central consécutives à une lésion locale touchent souvent des territoires tissulaires plus étendus que ceux de la lésion proprement dite. L'aire de diffusion des aminoacides excitateurs (glutamate) libérés autour du site semble correspondre à cet effet excito-toxique. Dans la mesure où 10 l'espace extracellulaire est en équilibre avec le liquide céphalo-rachidien, on peut envisager que des composés qui réduiraient la teneur en glutamate du liquide céphalo-rachidien pourraient limiter l'excito-toxicité et prévenir 15 l'extension des zones d'altération. L'expérience réalisée sur la figure 5 montre, à titre d'exemple, qu'un produit qui diminue la libération de glutamate a entraîné une baisse de glutamate dans le liquide céphalo-rachidien des animaux traités.

20

Exemple 6 : Etude de la libération de catécholamines.

25 L'invention se rapporte tout particulièrement à la mise au point d'un test particulièrement efficace de dosage, par chimiluminescence, des catécholamines dans des préparations de tissu nerveux. Ce test repose sur la double transformation inattendue de catécholamines par la lactoperoxydase, conduisant à l'émission de lumière, comme il est représenté sur la Figure 3d. Pour la mise en œuvre de ce test, l'échantillon comprenant le neuromédiateur est mis 30 en contact avec la lactopéroxydase et le luminol. De préférence, des volumes égaux de ces réactifs sont préalablement mélangés (par exemple 30 µl chacun), et le mélange est ensuite ajouté à l'échantillon (environ 6 µl). La réaction est préférentiellement réalisée dans une 35 solution saline composée de 136 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 20 mM tampon Tris pH 8,6, oxygéné (solution I). La

solution est placée dans un tube et introduite dans le luminomètre, sous agitation douce. Lorsque l'émission initiale diminue pour atteindre un niveau de base, le mélange peut être utilisé pour doser les catécholamines.
5 Pour un dosage en conditions standard, environ 3 µl de chaque réactif sont utilisés (soit 6 µl du mélange). Pour un dosage moins sensible, on peut utiliser environ 3 µl de luminol et 5 µl de lactopéroxydase dans une solution non saline composée de 120 mM sucrose, 120 mM tampon Tris pH
10 8,6, oxygénée (solution II).

Le dosage de catécholamines a été effectué à partir de différentes préparations de tissu nerveux, incluant les cellules adrénnergiques dissociées, les
15 microcubes de régions striatales du cerveau ou des lignées cellulaires chargées en catécholamine.

Des cellules adrénnergiques dissociées ont été préparées et utilisées dans un test de libération de
20 dopamine. Pour cela, 4 glandes adrénnergiques ont été dissociées dans un volume final de 2 ml de milieu Krebs mammifère. La libération a été testée sur des volumes de 5 à 10 µl, dans les solutions I ou II ci-dessus dans lesquelles le luminol (3 µl) et la lactopéroxydase (5 µl) ont été
25 ajoutés. La libération de catécholamine a été stimulée par l'ajout du ionophore calcique A23187 (1,2 µl) en présence de calcium (2,5 mM). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 6 et montrent que le test de l'invention permet un dosage rapide et sensible de la libération de catécholamine
30 sur de petits échantillons de tissu nerveux.

Des microcubes de régions striatales de cerveau ont été préparés à partir du cerveau de deux souris, qui ont été découpés et passés à travers une membrane de nylon (0,5 mm de section), puis repris dans un volume final de 2 ml dans un tube conique. Des échantillons de 10 µl du culot ont été utilisés pour effectuer le test de libération, dans les conditions décrites ci avant (dans 2 ml de solution I contenant 3 µl de luminol et 3 µl de lactopéroxydase). La

libération a été stimulée par dépolarisation au KCl (45 mM) en présence de calcium (2,5 mM). Des contrôles sans calcium ont été effectués, en présence de EGTA (7 µM). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 7, et montrent que le procédé de l'invention est sensible et permet de doser le neurotransmetteur libéré en réponse au calcium. Ce test peut être aisément utilisé pour l'identification ou la caractérisation de composés agissant sur cette libération de dopamine.

Des expériences similaires ont été réalisées à partir de lignées cellulaires chargées en dopamine (notamment de lignées de neuroblastes) et ont permis de confirmer la sensibilité et la reproductibilité du procédé de l'invention.

Exemple 7 : Etude de la libération de catécholamines.

Cet exemple plus détaillé que l'exemple 5 décrit un test basé sur une catécholamine luminescente et ses applications pour contrôler le relargage d'un transmetteur adrénnergique.

1) Matériel et méthodes.

a) Solutions et tampons.

Solution I : consiste en NaCl 136 mM, KCl 5,6 mM, MgCl₂ 1,2 mM, tampon Tris 20 mM pH 8,6 oxygéné.

Solution II : consiste en sucrose 120 mM, tampon Tris 120 mM pH 8,6 oxygéné.

Milieu de Krebs mammifères: NaCl 136 mM, KCl 5,6 mM, CaCl₂ 2,2 mM, MgCl₂ 1,2 mM, phosphate de Na 1,2 mM, bicarbonate de Na 2,5 mM, glucose 5,5 mM pH 7,4 oxygéné.

b) Solutions stocks.

La lactopéroxydase (E C 1. 11. 1. 7) de lait de vache a été achetée chez Sigma sous forme d'une poudre lyophilisée (80 à 150 unités par mg de protéine), elle a été dissoute dans 1 ml d'eau et gardée congelée par aliquotes de 100 µl.

5

Le luminol (5-amino-1,2,3,4-tetrahydrophtala
zindione-1,4) a été acheté chez Merck. Une solution stock a
été préparée en dissolvant 18 mg de luminol dans quelques
gouttes de NaOH 1M et le volume a été porté à 100 ml avec du
tampon Tris pH 8,6 0,2 M. Des aliquotes de 1 ml ont été
gardées à -20°C.

10

15

20

25

30

35

c) Mélange réactionnel.

Dans 2 ml de solution I les inventeurs ont
ajouté 3 µl de luminol et 3 µl de lactopéroxydase. Il a paru
préférable de mélanger un volume égal (30 µl de chaque) et
d'ajouter 6 µl du mélange gardé dans la glace. Le tube est
placé dans le luminomètre et la solution mélangée avec un
petit aimant. Quand l'éclair initial a décliné en une ligne
de base qui diminue lentement, le mélange peut être utilisé
pour mesurer les catécholamines (norépinéphrine, épinephrine,
dopamine). Si un test moins sensible est nécessaire, la
solution II est utilisée, à laquelle sont ajoutés 3 µl de
luminol et 5 µl de lactopéroxydase.

d) Extraits tissulaires.

50 à 100 mg de tissus sont coupés et extraits
pendant deux heures dans 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA)
refroidi dans la glace, les protéines dénaturées sont
centrifugées et le surnageant prélevé. Une aliquote de
0,25 ml a été diluée de moitié dans de l'eau et lavée à
l'éther 4 fois pour retirer le TCA (pH final : 4). Les traces
d'éther dans la phase aqueuse ont été évaporées. Un
échantillon est dilué 1/10 à 1/100 dans la solution I et
0,5 ml sont lavés dans 2 ml de chloroforme. Puis des
aliquotes de 40 µl de la phase aqueuse ont été traitées avec
10 µl de Triton X100 à 1% et la détermination a été réalisée
sur 3 à 5 µl. Chaque échantillon est comparé aux standards,
et il est essentiel de tester un blanc traité exactement
comme l'échantillon. Si le niveau du blanc est élevé, il faut
diluer le Triton jusqu'à ce que le blanc devienne négligeable
par comparaison avec l'échantillon (voir Fig.3).

e) Relargage de catécholamines de morceaux de
surrénales.

Deux souris ont été anesthésiées à l'éther, puis
leurs surrénales ont été retirées et coupées en 4 ou 5

morceaux qui ont été lavés 40 mn et 1 heure dans 400 ml de Krebs mammifère. Le relargage a été réalisé en solution I ou II dans laquelle le luminol et la lactopéroxydase sont augmentées respectivement jusqu'à 5 et 10 μ l. La dépolarisation avec du KCl 60 mM en présence de calcium 2,5 mM déclenche le relargage.

5 f) Relargage de catécholamines de cellules adrénnergiques dissociées.

Les morceaux ont été lavés comme précédemment et dissociés par plusieurs aspirations et rejets à travers une pipette (Eppendorf, cône de 1 ml) dans un volume final de 2 ml. Le relargage a été testé sur des aliquotes de 5 et 10 μ l. Davantage de matériel éteint le mélange réactionnel. Le relargage a été mesuré en solution I ou II dans lesquelles le luminol (3 μ l) et la lactopéroxydase (5 μ l) ont été ajoutés. Le relargage a été déclenché par l'addition de calcium ionophore A23187 (1,2 μ M) en présence de calcium 2,5 mM.

10 20 g) Relargage de catécholamines de micro fragments de cerveau striatal.

Les régions striatales du cerveau de deux souris ont été découpées et passées de force avec de grands volumes de Krebs à travers une gaze rigide de nylon (0,5 mm). Les micro fragments ont été collectés au fond du bêcher et concentrés en un volume final de 2 ml dans un tube conique. Le culot se forme rapidement par sédimentation et il est possible de prélever des échantillons de 10 μ l du culot. Ils sont ajoutés dans 2 ml de solution I contenant 6 μ l du mélange lactopéroxidase-luminol (un volume égal de chaque solution stock). Le relargage a été obtenu par dépolarisation au KCl (45 mM) en présence de 2,5 mM de calcium. Les contrôles en absence de calcium ont été réalisés avec 0,7 μ M d'EGTA dans la solution. Plus d'EGTA pourrait inhiber la réaction, cette condition donne autant de sensibilité pour les contrôles et pour les échantillons

25 30 35 h) Relargage de catécholamines de cellules enrichies en dopamine.

Des cultures cellulaires NG108-15 ont été maintenues dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM)

enrichi en glutamine 2 mM, sérum de veau fœtal 10%, HAT (hypoxanthine 100 µM, aminopterine 1 mM et thymidine 16 µM). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée de 95 % d'air et 5% de CO₂. Afin de charger les cellules en dopamine, les inventeurs ont ajouté, 16 heures avant l'expérience, un mélange de dopamine et d'acide ascorbique neutralisé pour obtenir une concentration finale de 10 mM de chaque dans le récipient de culture. La solution stock a été faite avec de l'acide ascorbique 0,5 M neutralisé par de la soude et avec de la dopamine 0,5 M pH 8,7. Les cellules sont lavées dans une solution consistant en NaCl 136 mM, KCl 5,6 mM, MgCl₂ 1,2 mM, tampon Tris 20 mM pH 8,6, glucose 5,5 mM oxygéné. Quatre lavages à 1200 RPM pendant 5 mn ont été réalisés. Le culot provenant des 4 récipients a été resuspendu dans 0,5 ml de Krebs.

Le relargage des cellules enrichies a été réalisé dans 2 ml de solution II contenant 3 µl de luminol et 5 µl de lactopéroxydase, il a été trouvé préférable de renforcer le mélange réactionnel après avoir ajouté les cellules (5 µl) en doublant le luminol et la peroxydase et en ajoutant 1 ml de plus de solution II. Quand le tracé est revenu à un niveau de base acceptable, le relargage a été déclenché par le calcium (1,6 mM) en présence de l'ionophore A 23187 (0,7 µM).

25 i) Localisation histochimique de la dopamine.

Les cellules ont été diluées de moitié avec une solution à 2 % de volume à volume d'acide glyoxylique contenant 0,5 mg % MgCl₂ pH 5. Les cellules ont été déposées sur une lamelle de verre, et la solution drainée. Les cellules ont été séchées à température ambiante puis traitées à 80°C pendant une demi-heure, avant d'être examinées dans le milieu adéquat pour les observations de la fluorescence. La procédure a été adaptée de Liu et al., 1992 suivant De La Torre 1980 et Knigge et al., 1977.

35 j) Figures.

La Figure 3d représente le principe du test catécholamine-luminescent.

La lactopéroxydase catalyse l'oxydation des catécholamines (dopamine, norépinephrine, épinéphrine) et

l'oxydation chimiluminescente du luminol, elle présente une fonction mixte oxydase-péroxydase.

La Figure 3e représente la courbe dose-réponse pour la dopamine et la norépinephrine.

Le mélange réactionnel, la solution I contenant la lactopéroxydase et le luminol(voir méthodes), donne une réaction chimiluminescente quand la catécholamine est ajoutée. Au-dessous des courbes est montrée une réponse typique dans la gamme des picomoles. La différence entre les deux courbes dépend de lot de lactopéroxydase et des solutions, elle ne correspond pas à une distinction spécifique entre les deux catécholamines.

La Figure 6 représente le relargage de catécholamines par des cellules adrénnergiques dissociées.

En A, le relargage a été mesuré en solution I saline, il a été induit par l'addition d'ionophore A23107 ($1,2 \mu\text{M}$) en présence de $2,5 \text{ mM}$ de calcium (tracé du haut). Quand le calcium a été réduit jusqu'à $10 \mu\text{M}$, le relargage est clairement plus faible mais pas négligeable (tracé du milieu). Sur le tracé du milieu, les pertes spontanées des cellules sont mesurées en absence d'ionophore.

En B, le relargage a été mesuré en solution II (sucrose-Tris) et a été provoqué par l'addition d'ionophore comme en A, en présence de calcium $2,5 \text{ mM}$ ou de calcium $10 \mu\text{M}$ (tracé du bas). Dans cette solution, le relargage apparaît comme négligeable en présence de faibles quantités de calcium, et les pertes spontanées ne sont pas mesurables.

La proportion de lactopéroxydase et de luminol est donnée dans la partie Méthodes.

La Figure 7 représente le relargage de catécholamine par des microfragments striataux.

Les morceaux de striatum ont été passés de force, avec un grand volume de Krebs, à travers une gaze de nylon rigide, les microfragments ont ensuite pu sédimentier et le striatum de 4 souris a été concentré dans un volume de 2 ml . Sur le tracé du haut, le relargage de catécholamine (probablement de la dopamine) a été provoqué par le KCl (45 mM) et le calcium ($2,5 \text{ mM}$). Quand le relargage décline, deux standards dopamine ont été injectés. Sur le tracé du

bas, une dépolarisation contrôle a été réalisée comme ci-dessus, mais en absence de calcium (plus 0,7 µM EGTA), aucun relargage n'a été mesuré, un standard a été injecté pour vérifier le mélange réactionnel. Dans les deux cas, 10 µl des microfragments prélevés du culot (voir Méthodes) ont été utilisés. Le relargage a été réalisé en solution I contenant de la lactopéroxydase et du luminol, comme décrit dans Méthodes.

La Figure 8 représente la détermination du contenu en catécholamine des extraits biologiques

L'extrait lavé au TCA et à l'éther a aussi été traité au chloroforme et au Triton, comme décrit dans Méthodes. Le contenu en catécholamine de l'extrait du striatum est comparé aux standards (gauche) et à un blanc traité exactement comme l'échantillon.

La Figure 9 représente le relargage de catécholamine par des fragments de glande surrénale.

Chaque glande surrénale de souris a été découpée en 4 morceaux lavés dans un grand volume (400 ml) de Krebs mammifère. Les morceaux ont été transférés dans la solution I (A) ou la solution II (B) et le relargage provoqué par la dépolarisation par le KCl (60 mM) en présence de Calcium (2,5 mM). Les proportions de lactopéroxydase et de luminol sont données dans la partie Méthodes. Les tracés du bas sont des contrôles réalisés en absence de Calcium (C) ou en absence de dépolarisation (D) en utilisant du NaCl 60 mM.

La Figure 10 représente le relargage de catécholamine par des cellules de neuroblastome enrichies en dopamine au cours de leur culture.

Haut : démonstration histochimique de la présence de dopamine dans les cellules NG108-15 enrichies en culture avec de la dopamine (2 mM). Le procédé à l'acide glyoxylique donné un composé fluorescent avec la dopamine. Les cellules ont été enrichies avec 2 à 10 mM de dopamine.

Bas : relargage de dopamine par les cellules enrichies. Les cellules NG108-15 ont été enrichies avec de la dopamine 10 mM ajoutée pendant 12 heures à la culture. Des cellules de quatre récipients à confluence ont été

rassemblées, lavées au moins quatre fois dans une solution saline et suspendues dans 0,5 ml de solution saline.

Gauche : le relargage a été mesuré sur 5 µl de suspension cellulaire en solution II contenant de la lactopéroxydase et du luminol comme décrit dans Méthodes. Le relargage a été provoqué par le calcium (1,6 mM) et A23187 (0,7 µM). Deux standards dopamine ont été injectés pour calibrer le relargage.

Droite : contrôle, les cellules enrichies en dopamine n'en ont pas relargué en absence de calcium (l'injection de NaCl remplace le calcium). Le standard montre que le mélange réactionnel aurait détecté toute dopamine relarguée.

15 2) Résultats

a) Test des catécholamines luminescentes.

Le test décrit résulte d'observations expérimentales montrant que la dopamine ou la norepinéphrine déclenchent l'oxydation chimiluminescente du luminol en présence de lactopéroxydase. L'interprétation la plus simple de la réaction est de considérer que la lactopéroxidase a une activité oxydase formant, à partir des catécholamines et de l'oxygène moléculaire, du peroxyde d'hydrogène qui réagit avec le luminol, la lactopéroxydase catalyse cette réaction chimiluminescente comme le ferait n'importe quelle peroxydase. La Figure 3d schématisé la fonction oxydase - peroxydase possible de la lactopéroxydase. La Figure 3e illustre deux courbes dose-réponse obtenues avec la norépinéphrine et la dopamine. La différence entre les deux courbes reflète seulement les propriétés de la préparation d'enzyme et de mélange utilisé dans les deux expériences. Au dessous des courbes sont montrés des éclairs de lumière typiques obtenus dans la gamme de 0,5 à 10 picomoles pour la dopamine. Des réponses équivalentes ont été enregistrées pour la norepinéphrine ou l'épinéphrine. Le test ne mesure pas la L-DOPA qui présente une augmentation lente de la ligne de base. La L-DOPA a inactivé le mélange de réaction, qui a perdu sa sensibilité à l'addition subséquente de

norépinéphrine ou de dopamine. La réaction ne détecte pas la sérotonine.

L'évaluation du contenu en catécholamines d'échantillons biologiques inconnus demande une extraction, et le traitement des échantillons qui diminue ou minimise les interférences possibles avec d'autres composés susceptibles d'être présents dans l'extrait, et particulièrement les lipides. L'échantillon lavé au TCA et à l'éther a aussi été mélangé avec du chloroforme, et une faible quantité de Triton a été ajoutée à la phase aqueuse, comme décrit dans Méthodes. La figure 8 montre une évaluation typique, dans laquelle le contenu en catécholamines de l'échantillon est comparé à des standards, un blanc est aussi réalisé avec la solution traitée exactement comme l'extrait biologique. Le tableau I ci-dessous donne les résultats pour cinq expériences différentes, le contenu en catécholamines, trouvé avec le test chimiluminescence est comparé à des valeurs trouvées dans la littérature en utilisant la fluorométrie ou d'autres méthodes.

20

Tableau I

	Méthode chimiluminescente	Méthode fluorométrique
Glande surrénale	490 ± 94	1100 *
Striatum	40 ± 10	54 ± 8,2 **
Canal déférent	11,9 ± 0,8	7,9 ***

Méthode chimiluminescence : moyenne ± SEM de 5 expériences différentes (μg par g de tissu frais).

25

* : Udenfriend (1962)

** : Cattabeni et al (1972)

*** : Cooper et al. (1978)

30

b) Relargage des catécholamines des tissus et des cellules.

Comme décrit précédemment pour les procédés chimiluminescents, le test des catécholamines peut être

adapté pour suivre le relargage à partir de coupes de tissus ou de cellules. Ceci a demandé quelques modifications en fonction de chacune des situations expérimentales. Dans le cas de coupes de surrénales, par exemple, l'une des difficultés est venue de la présence de quantités extracellulaires élevées qui épuisent le mélange réactionnel. Dans le cas de suspensions cellulaires, la turbidité de la solution et le matériel lipidique éteignent la chimiluminescence, et diminuent la sensibilité. Les inventeurs ont finalement pu adapter la procédure pour chaque expérience.

c) Relargage des catécholamines par des morceaux de surrénales

Chaque glande a été coupée en 4 ou 5 tranches lavées deux fois dans un grand volume de Krebs mammifères (voir Méthodes). Une tranche a été doucement transférée dans un mélange réactionnel, de la solution I ou de la solution II tamponnée à pH 8,6 et contenant de la lactopéroxydase et du luminol à des concentrations plus élevées, comme décrit dans Méthodes. Le relargage a été provoqué par dépolarisation au KCl en présence de calcium. La Figure 9 (A, B, C, D) montre que le relargage a été obtenu aussi bien dans une solution saline (A) que dans une solution sucrose-Tris (B), et qu'il est clairement dépendant du calcium. Des contrôles réalisés en absence de calcium ou après avoir injecté du NaCl au lieu de KCl, sont montrés au bas de la Figure 9 (C et D).

d) Relargage des catécholamines par des microfragments striataux

La procédure a aussi été testée sur des tranches striatales, prélevées sur des cerveaux de souris. Dans ce cas également, les fragments ont été lavés dans un grand volume de Krebs et laissés sédimenter avant de les collecter dans 2 ml de Krebs. Une aliquote de matériel est prélevée du culot et injectée dans le mélange réactionnel. Dans ce cas, les proportions de luminol et de lactopéroxydase utilisés dans le test (voir Méthodes) qui

donnent le maximum de sensibilité ont été gardées. Le relargage a également été provoqué par dépolarisation au KCl (Figure 7, tracé du haut), un contrôle en absence de calcium n'a pas montré de relargage de dopamine (Figure 7, tracé du bas). Dans les deux cas, un standard à la dopamine a montré que le mélange réactionnel était sensible à la dopamine et qu'il permet une évaluation du relargage Ca Dépendant du transmetteur.

e) Relargage des catécholamines de
suspensions cellulaires

Après avoir incubé les morceaux de surrénales dans du Krebs puis les avoir lavés pour enlever les substances interférentes, les morceaux ont été dissociés par plusieurs aspirations à la pipette ; la suspension obtenue à partir de 4 glandes surrénales a été recueillie dans un volume de 2 ml de Krebs. Le relargage a été réalisé en utilisant 5 à 10 μ l de solution, l'utilisation de davantage de cellules éteint le mélange réactionnel. La Figure 6 A et B a pour but de comparer le relargage de cellules de surrénales dans deux solutions différentes, solution I saline et solution II non saline. En A, le relargage à partir des cellules a été mesuré en solution saline et provoqué par le calcium ionophore (A23187) en présence de calcium 2,5 mM. Quand le calcium est réduit à 10 μ M, le relargage décline mais n'est pas négligeable (tracé du milieu). Le tracé le plus bas montre la perte spontanée en absence d'ionophore ou de calcium.

La Figure 6 B montre qu'en milieu non salin (solution II : sucrose Tris), le relargage de ces cellules peut encore être provoqué comme en A par l'ionophore A23187 et le calcium, mais la dépendance au calcium est plus évidente puisque le relargage est devenu négligeable en conditions de faible niveau de calcium. De plus, les pertes spontanées n'ont pas été détectées en sucrose-Tris. Il est probable qu'un comportement de relargage non dépendant du calcium, dû au gonflement des cellules, a lieu dans la solution saline.

f) Relargage de dopamine de cellules en culture enrichies en dopamine

Des travaux antérieurs ont montré que les cellules en culture pouvaient être enrichies en ACh, Glu ou Gaba en ajoutant le transmetteur dans le milieu de culture (Israel et al., 1994, 1997). Dans le cas particulier de cellules NG108-15, les inventeurs ont trouvé des articles montrant qu'elles pouvaient incorporer de la sérotonine ou des catécholamines (Furuya et al., 1985, Liu et al., 1992). Ils montrent ici que les cellules NG108-15 accumulent la dopamine du milieu de culture auquel 2 à 10 mM de dopamine ont été ajoutés. Les catécholamines doivent être protégées de l'auto oxydation en utilisant de l'acide ascorbique, en particulier pour les longues périodes d'incubation (voir Méthodes). La Figure 10 (haut) montre que les cellules sont réellement enrichies en dopamine. La caractérisation histochimique de la dopamine avec la procédure à l'acide glyoxylique rend les cellules fluorescentes. Les cellules chargées ont été capables de relarguer le neurotransmetteur en réponse à l'influx de calcium provoqué par A23187 en présence de calcium. Dans ce cas, il était nécessaire de renforcer le mélange réactionnel après avoir ajouté les cellules dans la solution II contenant les réactifs et l'ionophore. La dopamine extracellulaire est d'abord mesurée, et quand la ligne de base est atteinte, une quantité supplémentaire de luminol, de lactopéroxydase et 1 ml de solution II (voir Méthodes) a été ajouté. Quand la ligne de base a été atteinte, le relargage a été provoqué avec du calcium ((Figure 10, tracé de gauche)). Un contrôle dans lequel une injection de NaCl est réalisée à la place du calcium est montré en Figure 10 (tracé de droite)). Un relargage de dopamine clairement calcium-dépendant a été obtenu des cellules chargées.

35

3) Discussion.

Quand le présent projet a débuté, les inventeurs souhaitaient coupler l'oxydation des catécholamines par la monoamine oxydase à la détection de peroxyde d'hydrogène à

l'aide du luminol. Il a été trouvé par hasard que la lactopéroxydase était en elle-même suffisante pour catalyser à la fois l'oxydation des catécholamines et la détection du produit avec la chimiluminescence du luminol. Il est connu que les catécholamines sont détectées par des procédures ampérométriques, et que ces méthodes sont sensibles, la spécificité dépend de la relation entre le potentiel d'oxydoréduction des catécholamines et l'électrode de détection (Albillos et al., 1977, Pan et al., 1977). Dans le présent test, il est probable que l'oxydoréduction a lieu par l'intermédiaire du fer de la lactopéroxydase, il pourrait servir comme donneur d'électrons dans l'étape « oxydase » et de d'accepteur d'électron dans l'action de la peroxydase sur le luminol. Dans tous les cas, l'affinité de FeCl₃ pour les catécholamines est à la base de la « réaction de Vulpian » qui a permis de découvrir l'adrénaline dans la circulation adrénnergique. Il est alors probable que l'ion métallique de la peroxydase est essentiel pour expliquer le mécanisme des réactions observées.

Les inventeurs ont aussi observé que la procédure ne distingue pas la norepinéphrine, l'épinéphrine ou la dopamine, et que L-DOPA n'est pas mesurable, en dépit du fait qu'elle inactive le mélange réactionnel. D'autres transmetteurs, tels que la sérotonine oxydée par la monoamine oxydase, n'ont pas réagi lors du test à la lactopéroxydase. D'autres composés, l'ascorbate ou l'acétylcholine, ont peu ou pas d'effet.

Le procédé décrit peut être utilisé en complément d'autres méthodes. Le procédé est rapide et complète les autres méthodes développées pour l'ATP, l'ACh, le glutamate et le Gaba en utilisant le même luminomètre pour déterminer l'émission de lumière.

Les inventeurs ont aussi été capables de contrôler le relargage de catécholamines de diverses préparations adrénnergiques. Le procédé permet de détecter en continu le relargage. L'un des résultats pouvant être intéressant dans le futur est l'observation que certaines cellules peuvent être enrichies en dopamine lors de la culture. Ceci pourrait permettre de trouver les cellules

capables d'accumuler et de relarguer ce transmetteur, dans le but de corriger, un jour, un déficit dopaminergique comme dans la maladie de Parkinson (Bjorklund et Stenevi, 1985 ; Espejo et al., 1998). De plus, la méthode pourrait être utile pour trouver des composés pharmacologiques qui affectent la transmission adrénergique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5 Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G, Lindau M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. Nature 1997;389:509-512.
- 10 Bjorklund A, Steveni U. Intracerebral neuronal grafting. In : Neural grafting in the mammalian CNS, A. Bjorklund and U. Steveni Eds. Amsterdam Elsevier. 1985;3-14.
- 15 Cadet J, Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. Neurochem Int 1998,32:117-131.
- 20 Cattabeni F, Koslow SH, Costa E. Studies of neurotransmitters at the synaptic level. Edited by Costa E. Iversen L.L. and Paoletti R. In : Advances in biochemical psychopharmacology. Raven press NY. 1972;6:51
- 25 Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. In : Biochemical basis of neuropharmacology (third edition). Oxford University Press 1978;117.
- 30 De Luca M, McElroy WD. Purification and properties of firefly luciferase. In Methods in enzymology bioluminescence and chemiluminescence. Ed M.A. De Luca Acad Press NY. 1978;LVII:3-15.
- 35 De La Torre JC. An improved approach to histofluorescence using the SPG method for tissue monoamines. J Neurosci Method 1980;3:1-5.
- Espejo EF, Montoro RJ, Armengol AJ, Lopez-Barneo J. Cellular and functional recovery of Parkinsonian Rats after transplantation of carotid body cell aggregates. Neuron 1998;20:197-206.

5 Fosse MV, Kolstad J, Fonnum F. A bioluminescence method for the measurement of L-glutamate: application to the study of changes in the release of L-glutamate from lateral geniculate nucleus and superior colliculus after visual cortex ablation in rats. Journal of Neurochemistry. 1986;47:340-349.

10 Furuya S, Sawada M, Nagatsu T, Suzuki O, Higashida H. Localization of [³H] serotonin in neuroblastoma x Glioma hybrid cells. Brain Research 1985;361:77-90.

15 Israël M, Lesbats B. Continuous determination by a chemiluminescent method of acetylcholine release and compartmentation in *Torpedo* electric organ synaptosomes. Journal of Neurochemistry 1981 a;37:1475-1483.

20 Israël M, Lesbats B. Chemiluminescent determination of acetylcholine and continuous detection of its release from *Torpedo* electric organ synapses and synaptosomes. Neurochem Int. 1981 b;3:81-90.

25 Israël M, Lesbats B. Application to mammalian tissues of the chemiluminescent method for detecting acetylcholine. Journal of Neurochemistry. 1982;39:248-250.

30 Israël M, Lesbats B. The use of bioluminescence techniques in neurobiology, with emphasis on the cholinergic system. In : Neurochemistry, a practical approach (Turner AJ Bachelard HS Eds) IRL Press, Oxford 1987;113-135.

35 Israël M, Lesbats B. A bioluminescent - aminobutyrate assay for monitoring its release from inhibitory nerve endings. Journal of Neurochemistry 1996;67:2624-2627.

Israël M, Lesbats B, Bruner J. Glutamate and acetylcholine release from cholinergic nerve terminals, a

calcium control of the specificity of the release mechanism.
Neurochem Int 1993;22:53-58.

5 Israël M, Lesbats B, Synguelakis M, Joliot A.
Acetylcholine accumulation and release by hybrid NG108-15,
glioma and neuroblastoma cells - role of a 15 kDa membrane
protein in release. Neurochem Int 1994,25;103-109.

10 Israël M, Lesbats B, Tomasi M, Couraud PO,
Vignais L, Quinonero J, Tchelingerian JL. Calcium-dependent
release specificities of various cell lines loaded with
different transmitters. Neuropharmacology 1997;36:1789-1793.

15 Knigge KM, Hoffman G, Scott DE, Sladek JR.
Identification of catecholamine and luteinizing hormone-
releasing hormone (LHRH) containing neurons in primary
cultures of dispersed cells of the basal hypothalamus. Brain
Res 1977;120:393-405.

20 Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive
GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards RH. A cDNA that suppresses
 MMP^+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. Cell
1992;70:539-551.

25 Michelson AM. Purification and properties of
Pholas dactylus Luciferine and Luciferase. In Methods in
enzymology bioluminescence and chemiluminescence. Ed. M.A. De
Luca; Acad Press NY 1978;LVII:385-406.

30 Meunier FM, Israël M, Lesbats B. Release of ATP
from stimulated nerve electroplaque junction. Nature
1975;257:407-408.

35 Pan CY, Kao LS. Catecholamine secretion from
bovine Adrenal Chromaffin cells : The role of Na^+/Ca^{2+} Exchange
and the intracellular Ca^{2+} pool. J. Neurochem 1997;69:1085-
1092.

Takayama M, Itoh S, Nagasaki T and Tanimizu I. A new enzymatic method for determination of serum Choline-containing phospholipids. Clinica Chimica Acta 1977;79:93-98.

5 Tenne M, Finberg JP, Youdim MB, Ulitzur S. A New rapid ans sensitive bioluminescence assay for monoamine oxidase activity. J. Neurochem 1985;44:1378-1384.

10 Tenne M, Youdim MB, Ulitzur S, Finberg JP. Deamination of aliphatic amines by monoamine oxidase A and B studies using a bioluminescence technique. J Neurochem 1985;44:1373-1377.

15 Udenfriend S. In fluorescence assay in biology and medecine. Acad. Press NY 1962;1:158.

Requête enregistrée le 20/01/2010 à 10h00

REVENDICATIONS

5 1) Procédé d'identification de composés capables de moduler la libération de neuromédiateur, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux et en ce que l'on détermine l'éventuel effet modulateur dudit composé sur la libération de neuromédiateur par ladite préparation de tissu nerveux.

10 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux, puis l'on met ladite préparation ou son surnagent en présence d'une ou plusieurs substances dont l'une au moins est capable de réagir avec un neuromédiateur libéré par la préparation de tissu nerveux, et en ce que l'on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composés à tester en détectant ou en dosant une ou plusieurs desdites substances détectables si un neuromédiateur est libéré, ou en détectant ou en dosant au moins un produit résultant de la transformation de l'une desdites substances si un neuromédiateur est libéré.

25 3) Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le composé à tester est un composé isolé, un mélange de composé, un échantillon biologique, une banque combinatoire, une molécule synthétique ou naturelle.

30 4) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la préparation de tissu nerveux comprend des microcubes de matière cérébrale de mammifère.

35 5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la préparation de tissu nerveux comprend des microcubes de cortex cérébral.

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la préparation

de tissu nerveux comprend des fibres moussues de matière cérébrale de mammifère.

5 7) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la préparation de tissu nerveux comprend des fibres moussues du cervelet ou de l'hippocampe.

10 8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que après avoir mis en contact le composé ou les composés à tester avec la préparation de tissu nerveux, on prélève le surnageant sur lequel on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composés à tester en détectant ou en dosant une ou plusieurs desdites substances détectables si un neuromédiateur est libéré, ou en détectant ou en dosant au moins un produit résultant de la transformation de l'une desdites substances si un neuromédiateur est libéré.

20 9) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composé à tester par une détection ou un dosage de lumière émise.

25 10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce l'on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composés à tester sur la libération d'un ou plusieurs neurotransmetteur choisi parmi le glutamate (Glu), l'acétylcholine (Ach), le γ -aminobutyrate (Gaba), les catécholamines notamment la dopamine (DA), ou l'ATP.

30 35 11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence d'une ou plusieurs enzymes dont le substrat de l'une au moins est un neuromédiateur et d'au moins un agent capable d'émettre de la lumière suite à la dégradation dudit neuromédiateur par son enzyme.

12) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, d'acétylcholinestérase, de cholineoxydase, de peroxydase, et de luminol, et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du luminol suite à la dégradation par l'acétylcholinestérase de l'acétylcholine libérée par la préparation de tissu nerveux.

13) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, de glutamate desydrogénase, d'oxydoréductase, de luciférase, de NAD et de décaldéhyde, et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du décaldéhyde suite à la dégradation par la glutamate desydrogénase du glutamate libéré par la préparation de tissu nerveux.

14) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, de gabase, d'oxydoréductase, de luciférase, de NAD et de FMN et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du SSAL suite à la dégradation par la gabase du Gaba libéré par la préparation de tissu nerveux.

15) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, de lactoperoxydase, d' O^2 et de luminol et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière

émise par la dégradation du luminol suite à la dégradation par la lactoperoxydase d'une catécholamine libéré par la préparation de tissu nerveux.

5 16) Un kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - une ou plusieurs préparations de tissus nerveux dans des compartiments séparés,

15 - une ou plusieurs substances dont l'une au moins est capables de réagir avec un neuromédiateur libéré par la préparation de tissu nerveux, et l'une au moins desdites substances est détectable si un neuromédiateur est libéré ou dont au moins un produit résultant de la transformation de l'une desdites substances est détectable si un neuromédiateur est libéré.

20 - éventuellement un ou plusieurs composés de référence dont l'effet sur la libération d'un ou plusieurs neuromédiateurs par la préparation de tissu nerveux est connu.

25 17) Un composé capables de moduler la libération pré synaptique d'un ou plusieurs neuromédiateurs, identifiable par un procédé selon l'une quelconque des revendication 1 à 15.

30 18) Utilisation d'un composé selon la revendication 17 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention de maladies du système nerveux.

REVENDICATIONS

5 1) Procédé d'identification de composés capables de moduler la libération de neuromédiateur, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux et en ce que l'on détermine l'éventuel effet modulateur dudit composé sur la libération de neuromédiateur par ladite préparation de tissu nerveux.

10 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux, puis l'on met ladite préparation ou son surnagent en présence d'une ou plusieurs substances dont l'une au moins est capable de réagir avec un neuromédiateur libéré par la préparation de tissu nerveux, et en ce que l'on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composés à tester en détectant ou en dosant une ou plusieurs desdites substances détectables si un neuromédiateur est libéré, ou en détectant ou en dosant au moins un produit résultant de la transformation de l'une desdites substances si un neuromédiateur est libéré.

25 3) Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le composé à tester est un composé isolé, un mélange de composé, un échantillon biologique, une banque combinatoire, une molécule synthétique ou naturelle.

30 4) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la préparation de tissu nerveux comprend des microcubes de matière cérébrale de mammifère.

35 5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la préparation de tissu nerveux comprend des microcubes de cortex cérébral.

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la préparation

de tissu nerveux comprend des fibres moussues de matière cérébrale de mammifère.

5 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la préparation de tissu nerveux comprend des fibres moussues du cervelet ou de l'hyppocampe.

10 8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que après avoir mis en contact le composé ou les composés à tester avec la préparation de tissu nerveux, on prélève le surnageant sur lequel on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composés à tester en détectant ou en dosant une ou plusieurs desdites substances détectables si un neuromédiateur est libéré, ou en détectant ou en dosant au moins un produit résultant de la transformation de l'une desdites substances si un neuromédiateur est libéré.

20 9) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composé à tester par une détection ou un dosage de lumière émise.

25 10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce l'on détermine l'éventuel effet modulateur du ou des composés à tester sur la libération d'un ou plusieurs neurotransmetteur choisi parmi le glutamate (Glu), l'acétylcholine (Ach), le γ -aminobutyrate (Gaba), les catécholamines notamment la dopamine (DA), ou l'ATP.

35 11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence d'une une plusieurs enzymes dont le substrat de l'une au moins est un neuromédiateur et d'au moins un agent capable d'émettre de la lumière suite à la dégradation dudit neuromédiateur par son enzyme.

12) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, d'acétylcholinestérase, de cholineoxydase, de peroxydase, et de luminol, et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du luminol suite à la dégradation par l'acétylcholinestérase de l'acétylcholine libéré par la préparation de tissu nerveux.

13) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, de glutamate desydrogénase, d'oxydoréductase, de luciférase, de NAD et de décaldéhyde, et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du décaldéhyde suite à la dégradation par la glutamate desydrogénase du glutamate libéré par la préparation de tissu nerveux.

14) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, de gabase, d'oxydoréductase, de luciférase, de NAD et de FMN et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière émise par la dégradation du SSAL suite à la dégradation par la gabase du Gaba libéré par la préparation de tissu nerveux.

15) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un composé à tester avec une préparation de tissu nerveux puis l'on met ladite préparation ou son surnageant en présence, successivement ou simultanément, de lactoperoxydase, d' O^2 et de luminol et en ce que l'on détecte ou l'on dose la lumière